

Barbara Kołwzan

Usuwanie zanieczyszczeń naftowych z gruntu metodą pryzmowania

W ostatnich latach nastąpił szybki rozwój technologii oczyszczania wód i gruntów zanieczyszczonych produktami naftowymi, przy czym do najczęściej wykorzystywanych należą technologie oparte na metodach biologicznych [1–4]. Uważa się, że są one bardziej przyjazne środowisku, a przede wszystkim tańsze. Jedynym ograniczeniem ich stosowania jest toksyczność związków wchodzących w skład produktów naftowych, która powoduje zahamowanie procesu biodegradacji. Dlatego też zabiegi bioremediacyjne poprzedzone są zwykle zebraniem wolnego produktu naftowego z powierzchni ziemi lub wody oraz jego spompowaniem z warstwy wodonośnej, jeżeli nastąpiło takie zanieczyszczenie.

Podstawową rolę w procesie biologicznego oczyszczania spełniają mikroorganizmy zdolne do wykorzystania węglowodorów w charakterze źródła węgla i energii [5–7]. Różnorodne technologie wykorzystują biodegradacyjną działalność mikroorganizmów oraz koncentrują się na zwiększeniu wydajności już istniejących – lecz powolnych – procesów samooczyszczania zachodzących w przyrodzie [8–9]. O szybkości przebiegu procesów biologicznego rozkładu zanieczyszczeń naftowych decydują takie parametry, jak [10–13]:

- liczba i aktywność degradacyjna drobnoustrojów,
- struktura chemiczna węglowodorów i ich toksyczność w stosunku do mikroflory,
- biodostępność węglowodorów wynikająca z ich rozpuszczalności oraz sorpcji węglowodorów w glebie,
- obecność odpowiedniego akceptora elektronów,
- sprzyjające warunki środowiskowe, takie jak temperatura, światło, pH, zawartość tlenu, wilgotność, potencjał redoks,
- zawartość związków biogennych, tj. azotu i fosforu i ich wzajemne relacje oraz w stosunku do węgla pierwiastkowego wchodzącego w skład węglowodorów lub innych związków organicznych obecnych w glebie,
- zawartość węglowodorów; za małe i zbyt duże stężenie substratu może ograniczać biodegradację,
- obecność innych źródeł węgla niż węglowodory,
- obecność innych związków toksycznych i inhibujących proces.

Metody biologicznego oczyszczania można podzielić w zależności od obecności tlenu w środowisku na tlenowe, beztlenowo-tlenowe i beztlenowe [14]. Metody rozkładu tlenowego należą do najczęściej stosowanych,

gdyż umożliwiają całkowitą mineralizację zanieczyszczeń. Drobnoustroje tlenowe wykorzystują tlen cząsteczkowy, jako akceptor elektronów i wodoru oderwanego od substratu. Źródłem tlenu w procesach oddechowych może być powietrze atmosferyczne dostające się do gruntu w sposób bierny lub wymuszony. Droga bierna polega na naturalnej penetracji powietrza do gruntu z atmosfery, natomiast aktywne zwiększenie ilości dostarczanego tlenu może odbywać się poprzez mechaniczne przemieszanie powierzchniowych warstw gruntu (bronowanie, oranie itp.), wprowadzanie specjalnych perforowanych lanc wbitych bezpośrednio w grunt lub jego napowietrzanie za pomocą pomp i dmuchaw. Ponadto wzbogacanie środowiska w tlen może odbywać się przez zastosowanie nadtlenu wodoru, który rozkłada się w glebie do wody i tlenu [15]. W warunkach beztlenowych akceptorem elektronów i wodoru oderwanego od substratu organicznego mogą być związki mineralne, takie jak azotany, siarczany czy węglany. W tym przypadku rozkład mikrobiologiczny zanieczyszczeń jest jednak znacznie wolniejszy, a powstające produkty mogą mieć charakter toksyczny. W niektórych sytuacjach, jak w przypadku degradacji związków chloroorganicznych, stosuje się systemy mieszane beztlenowo-tlenowe. Pierwszy etap procesu odbywa się w warunkach beztlenowych, gdzie następuje dechloracja związku, natomiast etap drugi (tlenowy) zapewnia ostateczną degradację związku organicznego [16].

W zależności od stopnia zanieczyszczenia oraz charakteru rekułtywowanego środowiska, bioremediacja może odbywać się metodą *in situ* (bioremediacja stymulowana napowietrzaniem, bioremediacja stymulowana wodą, obróbka agrotechniczna, fitoremediacja) lub *ex situ* (metoda rolnicza, pryzmowania oraz bioreaktorowa). Metody *in situ* stosowane są wówczas, gdy występują zanieczyszczenia mało toksyczne, które nie stwarzają zagrożenia oraz w sytuacji, gdy nie ma niebezpieczeństwa migracji zanieczyszczeń w środowisku gruntowo-wodnym.

Szybkie i skuteczne przeprowadzenie procesu bioremediacji gruntu zależy od liczebności i aktywności degradacyjnej mikroorganizmów glebowych. Początkową dużą liczebność mikroorganizmów w gruncie można osiągnąć przez wzbogacenie gleby w substancje biogenne i regulację innych parametrów środowiska decydujących o ich rozwoju oraz poprzez dodatkowe zaszczerpienie gruntu mikroorganizmami po ich uprzednim namnożeniu w bioreaktorze. W technologiach oczyszczania gruntu opartych na metodach biologicznych wykorzystuje się zarówno mikroorganizmy pochodzące ze środowisk skażonych, jak

i szczepki przygotowane w wyspecjalizowanych laboratoriach mikrobiologicznych. Uprzednio przeprowadzone badania wykazały, że najlepsze efekty uzyskuje się stosując do inokulacji gruntu biopreparaty, w skład których wchodzi mikroorganizmy autochtoniczne. Obok dużej skuteczności biologicznego rozkładu zanieczyszczeń stosowanie tych preparatów jest także bezpieczne z ekologicznego punktu widzenia [17–19].

Celem przedstawionych badań była ocena przebiegu procesu bioremediacji gruntu metodą przyzmywania, przeprowadzona na podstawie analizy wskaźników mikrobiologicznych i fizyczno-chemicznych gruntu oraz odcieku z przyzmy. Zadaniem prac bioremediacyjnych było usunięcie produktów naftowych z gruntu zgromadzonego na przyzmy, przy uwzględnieniu istniejących na obiekcie uwarunkowaniach natury technicznej, hydrogeologicznej i biologicznej.

Materiały i metody

Badania mikrobiologiczne i fizyczno-chemiczne

Oznaczenia drobnoustrojów w gruncie dokonano metodą bezpośredniego liczenia kolonii na płytkach lub metodą rozcieńczeń McCrady'ego, stosując odpowiednie podłoża hodowlane [17]. Wyniki analiz podano w postaci jednostek tworzących kolonie (jtk) w 1 g gleby lub najbardziej prawdopodobnej liczby bakterii (NPL) w 1 g gleby.

Aktywność dehydrogenazową gleby oznaczono zmodyfikowaną metodą wg [20], natomiast aktywność katalazową określono metodą manganometryczną wg [21].

Analizę fizyczno-chemiczną gleby oraz odcieków z przyzmy wykonano zgodnie z obowiązującymi procedurami [22], oznaczając przewodność właściwą, pH, zasadowość ogólną, kwasowość, utlenialność, BZT₅, ChZT, ekstrakt eterowy, fosfor ogólny, fosforany, chlorki, siarczany, azot organiczny, azot amonowy, azotyny, azot ogólny Kjeldahla, azot ogólny, suchą pozostałość, pozostałość po prażeniu, stratę prażenia, ciała rozpuszczone (ogólne, mineralne i lotne), zawiesiny (ogólne, mineralne i lotne).

Analiza statystyczna wyników została przeprowadzona metodami analityczną i graficzną przy pomocy pakietu Statgraphics [23].

Analiza produktów naftowych w gruncie

Zawartość produktów naftowych w gruncie analizowano na chromatografie GC FID z kolumną kapilarną o długości 25 m, w warunkach programowania temperatury: 30°C–5 min, 3°C/min, 240°C–10 min. Jako gaz nośny użyto hel, a do detektora – wodór i powietrze. Temperatura detektora wynosiła 300°C. Analizę jakościową wykonano przy użyciu aparatu GC/MS z kolumną kapilarną HP-5 o długości 25 m z programowaną temperaturą wg [24–25].

Przygotowanie inokulantu

Biopreparat o symbolu BIO2 został sporządzony na bazie bakterii naturalnie zasiedlających zanieczyszczony grunt. Namnażanie inokulantu stosowanego w postaci zawiesiny odbywało się wielofazowo i uwzględniało stopniową zmianę skali hodowli. Do hodowli zastosowano podłoża mineralne zawierające olej napędowy w charakterze substratu pokarmowego. Pierwszy etap prac odbywał się w skali laboratoryjnej, gdzie hodowlę-1 prowadzono w objętości 1 dm³ podłoża mineralnego, po czym cała objętość

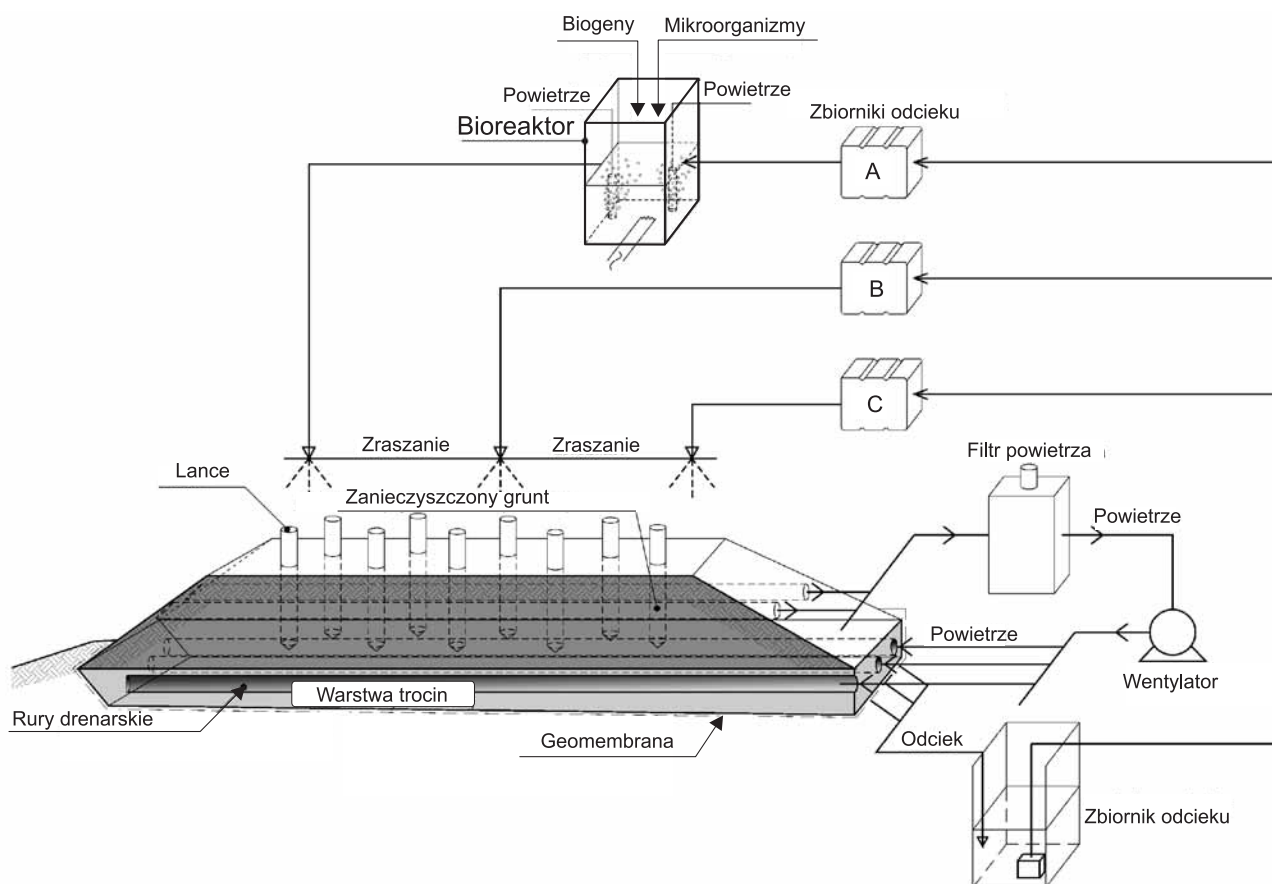
posłużyła do zaszczepienia hodowli-2 o objętości 10 dm³, prowadzonej także w skali laboratoryjnej. Ostatni etap namnażania inokulantu prowadzony był w warunkach polowych. Bakterie hodowano w bioreaktorach odpowiednio napowietrzanych i zaopatrzonych w regulator pozwalający na utrzymanie temperatury 20±2°C. Reaktory zawierały, w zależności od potrzeb, od 30 dm³ do 500 dm³ hodowli, która została użyta bezpośrednio do zaszczepienia gruntu. Bakterie wprowadzono do gruntu po osiągnięciu przez hodowlę późnej fazy wzrostu logarytmicznego.

Charakterystyka zanieczyszczonego gruntu i uformowanie przyzmy

W literaturze światowej coraz częściej wskazuje się na przydatność procesów bioaugmentacji i biostymulacji do szybkiego i skutecznego usuwania zanieczyszczeń z gruntu [7–8]. Wyniki własnych badań laboratoryjnych i lizymetrycznych potwierdziły te doniesienia [17,18]. Zwrócono jednak uwagę na konieczność dostosowania opracowanej technologii oczyszczania do konkretnego przypadku zanieczyszczenia gruntu. Wymaga to znajomości wielu parametrów, w tym danych dotyczących ilości, rodzaju i rozmieszczenia zanieczyszczeń w gruncie, budowy geologicznej terenu, położenia warstw wodonośnych i kierunku przepływu wód gruntowych. Zastosowanie metod *in situ* możliwe jest tylko wówczas, gdy nie ma niebezpieczeństwa migracji zanieczyszczeń lub ich metabolitów w środowisku gruntowo-wodnym. W toku procesu rozkładu węglowodorów powstają polarne metabolity, przy czym wykazano, że niektóre z nich mogą być bardziej toksyczne niż węglowodory [26–27]. Ponadto drobnoustroje wykorzystywane w procesach bioremediacji wytwarzają wiele substancji powierzchniowo czynnych, które zwiększają przyswajalność węglowodorów, ale mogą także powodować desorpcję zanieczyszczeń z gruntu i ułatwiać ich migrację.

Coraz częściej do usuwania zanieczyszczeń naftowych z gruntu stosuje się metodę przyzmywania. Odpowiednio przygotowana przyzma zapewni odizolowanie zanieczyszczonego gruntu od środowiska i uniemożliwi rozprzestrzenianie się zanieczyszczeń. Wadą tej metody jest konieczność stosowania wymuszonego napowietrzania gruntu, co znacznie zwiększa koszty oczyszczania. Często lokalne warunki wymuszają formowanie wysokich przyzm, których napowietrzanie jest szczególnie trudne. Takiego trudnego zadania podjęto się na składowisku w Łęczycy koło Zielonej Góry, gdzie przyzma uformowana na niewielkiej powierzchni miała wysokość około 3 m. Grunt zgromadzony w postaci przyzmy pochodził z rejonu stacji paliw płynnych PKS [28]. Przyczyną jego zanieczyszczenia były nieszczelność zbiorników oraz nieostrożne tankowanie produktów naftowych. W toku modernizacji stacji paliw wydobyto zbiorniki, a grunt znajdujący się w ich otoczeniu został usunięty ze względu na znaczne zanieczyszczenie benzyną i olejem napędowym.

Właściwe prace bioremediacyjne poprzedzono przygotowaniem terenu pod składowisko, uszczelnieniem dna przyzmy, jej uformowaniem oraz odpowiednim wyposażeniem technologicznym terenu. Jako uszczelnienie zastosowano geomembranę PEHD o grubości 1,5 mm (część boczna) oraz 2,0 mm (część denna). W ramach wymaganych technologią prac oczyszczających na dnie tymczasowego składowania zanieczyszczonego gruntu ułożono dodatkowo warstwę trocin drzewnych, dzięki czemu geomembrana straciła bezpośredni kontakt z zanieczyszczonym gruntem



Rys. 1. Schemat procesu bioremediacji metodą przyzmywania
 Fig. 1. Flow diagram of bioremediation by the prism method

zawierającym kamienie i drobny gruz. W celu dogodnego odpompowania ewentualnych odcieków wykonany został niewielki spadek dna składowiska. Uformowano przyzmę o szerokości 10,5 m i długości 27 m, gdzie zgromadzono grunt o następujących parametrach:

- kubatura gruntu zanieczyszczonego: ok. 960 m³,
- zawartość zanieczyszczeń w postaci węglowodorów naftowych (w przeliczeniu na suchą masę gruntu): 68÷3042 mg/kg,
- rodzaj gruntu: piasek gliniasty, gliny piaszczyste i pylaste, gliny,
- współczynnik filtracji: $1,4 \cdot 10^{-5} \div 7,6 \cdot 10^{-5}$ m/s,
- pH odcieku z przyzmy: 6,09.

Charakterystyka biopreparatu

Do bioaugmentacji przyzmy zastosowano preparat zawierający mikroorganizmy autochtoniczne zasiedlające zanieczyszczony grunt. Selekcja mikroflory pochodzącej z zanieczyszczonego gruntu pozwoliła na wyodrębnienie dwóch aktywnych degradacyjnie szczepów bakterii. Skuteczność biodegradacji oleju napędowego przez wyizolowane bakterie po 21 d inkubacji w hodowli płynnej wyniosła 82,1%. Wykazano, że płyn pochodzący nie zawierał substancji cytotoksycznych (test MTT) oraz o potencjalnych właściwościach mutagennych i rakotwórczych (test Ames). Badania diagnostyczne wykonane przy zastosowaniu testu ID 32 GN firmy Biomerieux wykazały przynależność szczepów wchodzących w skład inokulantu do dwóch gatunków, tj. *Stenotrophomonas maltophilia* i *Pseudomonas putida* [17].

Technologia biologicznego oczyszczania gruntu

Zadaniem opracowanej technologii było nie tylko usunięcie zanieczyszczeń, ale przede wszystkim – z uwagi na usytuowanie przyzmy w pobliżu terenów miejskich – uniknięcie jakichkolwiek zagrożeń związanych z możliwością przedostania się zanieczyszczeń do środowiska. Podstawą opracowanej technologii było zapewnienie drobnoustrojom degradującym produkty naftowe optymalnych warunków wzrostu i rozwoju, takich jak natlenienie, pH, wilgotność oraz odpowiednia zawartość biogenów. Bioremediację gruntu prowadzono wykorzystując procesy beztlenowego i tlenowego rozkładu substancji organicznych przez mikroorganizmy. Schemat technologii bioremediacji gruntu przedstawia rysunek 1.

Właściwe natlenienie gruntu uzyskano w wyniku zastosowania systemu rur drenarskich, przez które włączano powietrze. Polietylenowe rury drenarskie o średnicy 80 mm umieszczono w obsypce trocinowej na dnie przyzmy oraz na wysokości 1,6 m. Powietrze z przyzmy kierowano na filtr z węglem aktywnym (ok. 30 kg), co zabezpieczało przed skażeniem otaczającej atmosfery związkami lotnymi uwalnianymi z gruntu podczas przewietrzania. Ponadto w gruncie umieszczono dodatkowo na głębokości 1,5÷3,0 m lance wykonane z perforowanych rur winidurowych, zapewniające dostęp powietrza, które służyły także do wprowadzania namnożonych bakterii oraz biogenów. pH gruntu utrzymywano w przedziale 6÷8, a jego wilgotność wahała się od 10% do 20% w zależności od warunków atmosferycznych. Nadmiar wody w okresie deszczowym odprowadzany był do trzech zbiorników paletowych o pojemności 1 m³ znajdujących się w pobliżu przyzmy.

Zebrany odciek służył do namnażania bakterii, zraszania pryzmy w okresach suszy oraz do rozpuszczania nawozów mineralnych, w które wzbogacano grunt. W sytuacjach awaryjnych niedobór wody uzupełniano poprzez zraszanie gruntu wodą studzienną. Starano się, aby prowadzone zabiegi technologiczne pozwoliły na utrzymanie wilgotności gruntu zbliżonej do 50% WHC.

Skuteczne prowadzenie procesu bioremediacji wymagało uzupełnienia zawartości niektórych związków w gruncie, które są niezbędne do życia drobnoustrojów. Osiągnięto to przez sukcesywne wprowadzanie do gruntu azotanu amonu i fosforanu amonu w postaci nawozów mineralnych, w ilościach dobieranych na podstawie badań eksperymentalnych. Ostateczna zawartość azotu i fosforu w gruncie kształtowała się zgodnie z proporcją C:N:P=100:10:1, która, jak wykazały wcześniejsze badania, była optymalna w przypadku gleb lekkich [17].

Liczebność drobnoustrojów degradujących węglowodory zwiększono na drodze bioaugmentacji. Bakterie wprowadzano do gruntu poprzez zraszanie biopreparatem oraz wtłaczanie go do głębszych warstw gruntu systemem lanc. Dzięki przyjętej technologii, charakteryzującej się

zamkniętym obiegiem wody, uniknięto wtórnego zanieczyszczenia otaczającego terenu toksycznymi związkami chemicznymi oraz mikroorganizmami uwalnianymi z pryzmy. Zatem gwarantowała ona dużą skuteczność i bezpieczeństwo. Biopreparat wprowadzano do gruntu okresowo w ilościach zapewniających NPL bakterii degradujących węglowodory w granicach 10^6 - 10^8 kom./g. Właściwy przebieg procesu oczyszczania gruntu zapewniał stały monitoring fizyczno-chemiczny i biologiczny.

Wyniki badań

Początkowa zawartość zanieczyszczeń w gruncie (odniesiona do suchej masy) była nierównomierna – od 68 mg/kg do 3042 mg/kg. Analiza jakościowa wykazała, że zanieczyszczenia te stanowiły węglowodory parafinowe (od C₁₂ do C₃₅), alkiloaromaty oraz związki naftenowe. Wykryto tylko śladowe ilości wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych. Kształtowanie się wybranych wskaźników jakości gruntu przed bioremediacją przedstawia tabela 1.

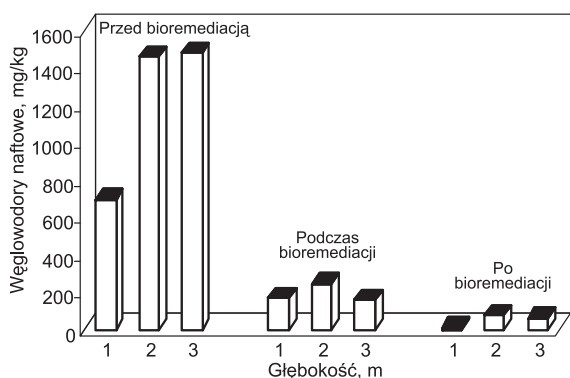
Tabela 1. Wybrane wskaźniki jakości gruntu przed bioremediacją
Table 1. Some properties of soil before bioremediation

Punkt pomiarowy/ głębokość, m	Węglowodory naftowe mg/kg	pH	Wilgotność %	P ₂ O ₅ %	Azot amonowy %	Azotany %	Aktywność dehydrogenazowa mgTF/g·24 h	Liczba bakterii tys. jtk/g
P1/1	68	7,6	29,12	0,00030	0,0034	0,0017	10,108	22,3
P1/2	2404	7,4	21,44	0,00020	0,0234	0,0012	23,704	95,4
P1/3	1912	7,6	18,32	0,00010	0,0068	0,0058	24,906	117,4
P2/1	866	6,4	27,12	0,00040	0,0055	0,0010	28,605	103,0
P2/2	2006	7,2	13,38	0,00010	0,0113	0,0011	8,732	14,5
P2/3	3042	6,3	16,24	0,00020	0,0087	0,0010	11,227	24,3
P3/1	1004	6,7	12,33	0,00020	0,0062	0,0024	10,969	31,2
P3/2	1088	7,0	13,40	0,00004	0,0098	0,0013	15,537	43,2
P3/3	528	6,4	20,67	0,00005	0,0097	0,0010	8,130	12,3
P4/1	844	5,9	16,05	0,00030	0,0066	0,0011	5,506	8,7
P4/2	346	6,0	17,80	0,00004	0,0110	0,0016	27,616	112,0
P4/3	448	5,7	15,10	0,00003	0,0088	0,0010	7,527	14,2

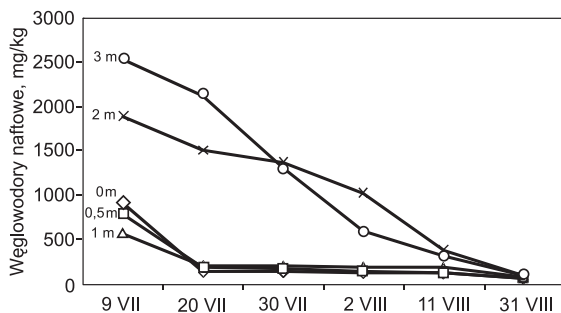
Tabela 2. Wybrane wskaźniki jakości gruntu po bioremediacji
Table 2. Some properties of soil after bioremediation

Punkt pomiarowy/ głębokość, m	Węglowodory naftowe mg/kg	pH	Wilgotność %	P ₂ O ₅ %	Azot amonowy %	Azotany %	Aktywność dehydrogenazowa mgTF/g·24 h	Liczba bakterii tys. jtk/g
P1/1	<1	5,81	28,02	0,00040	0,0026	0,00560	8,008	27 200
P1/2	41,3	7,08	20,34	0,00010	0,0202	0,00050	22,564	324,5
P1/3	<1	7,97	19,22	0,00010	0,0717	0,00050	5,996	783,0
P2/1	33,2	5,78	28,02	0,00030	0,0065	0,00330	18,554	12 450
P2/2	35,9	7,18	12,28	0,00010	0,0220	0,00034	12,765	897
P2/3	48,7	6,94	17,04	0,00010	0,0382	0,00070	16,443	67,5
P3/1	<1	5,66	12,32	0,00030	0,0062	0,00130	9,879	33 290
P3/2	221,1	7,48	11,43	0,00005	0,0181	0,00030	13,879	98,7
P3/3	12,7	7,56	19,87	0,00005	0,0159	0,00020	10,768	77,3
P4/1	<1	5,66	14,04	0,00030	0,0062	0,00130	7,896	11 230
P4/2	11,9	7,75	11,79	0,00003	0,0140	0,00380	19,546	65,1
P4/3	186,8	7,75	15,06	0,00003	0,0140	0,00380	6,789	87,3

Prace rekultywacyjne przeprowadzono w trzech fazach. Fazę wstępną rozpoczęto w okresie jesienno-zimowym. Z uwagi na zbliżającą się zimę prace zakończono przykryciem pryzmy folią z PEHD o grubości 0,5 mm i 0,3 mm. Stanowiła ona izolację pozwalającą na zatrzymanie ciepła wewnątrz pryzmy i eliminowała dostęp tlenu wraz z powietrzem atmosferycznym, umożliwiając przebieg procesów beztlenowych. W okresie wiosennym następnego roku rozpoczęto właściwy proces bioremediacji w warunkach intensywnego natlenienia (faza II). Przed przystąpieniem do bioremediacji wyznaczono podstawowe parametry gruntu mające zasadniczy wpływ na aktywność degradacyjną mikroorganizmów glebowych. Fazę III procesu stanowiło doczyszczanie gruntu, które polegało na stopniowym zbieraniu powierzchniowych warstw gruntu, gdzie oznaczona zawartość produktów naftowych była minimalna. Pozwoliło to na odkrycie dolnych warstw gruntu, do których dostęp tlenu był wcześniej ograniczony. Przebieg procesu bioremediacji w warunkach połowych kontrolowano dokonując stałego monitoringu podstawowych wskaźników jakości gruntu. Próbkę gruntu do analizy pobierano w czterech wyznaczonych punktach pomiarowych (P1–P4) z powierzchni gruntu oraz z głębokości 0,5 m, 1 m, 2 m i 3 m (tab. 2, rys. 2 i 3). Najczęściej dokonywano pomiarów w punkcie P2, gdzie zanieczyszczenie gruntu było początkowo największe. Wyniki badań monitoringowych pozwoliły na płynne sterowanie procesem biodegradacji.



Rys. 2. Średnia zawartość węglowodorów naftowych w gruncie na różnych głębokościach
Fig. 2. Petroleum hydrocarbons concentration in soil at different depth

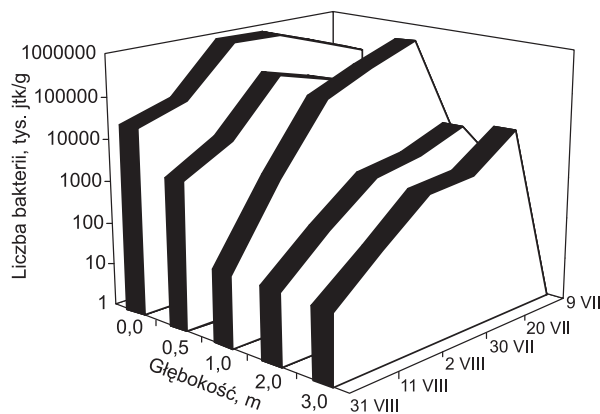


Rys. 3. Średnia zawartość węglowodorów naftowych w gruncie (P2)
Fig. 3. Petroleum hydrocarbons concentration in soil (measuring point P2)

Skuteczność biodegradacji zanieczyszczeń naftowych w gruncie różniła się w poszczególnych fazach procesu bioremediacji. Pierwsza faza odbywała się w okresie zimowym, w warunkach ograniczonego dostępu tlenu i niskich temperatur gruntu. Pomimo warunków niekorzystnych do rozwoju mikroorganizmów, uzyskano zmniejszenie

zawartości zanieczyszczeń naftowych w gruncie do przedziału 33÷2540 mg/kg. Największą intensywność przebiegu procesów degradacyjnych zanotowano w okresie wiosenno-letnim (II faza). Ubytek węglowodorów nastąpił wówczas na wszystkich badanych głębokościach pryzmy (rys. 2 i 3).

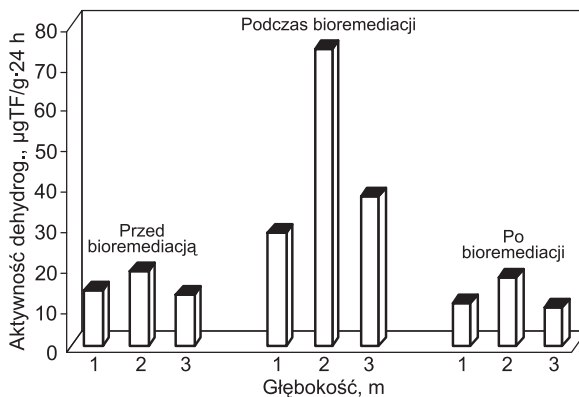
Produkty naftowe zostały najszybciej wyeliminowane z powierzchniowych warstw pryzmy. Oczyszczanie warstw położonych na głębokościach 2 m i 3 m przebiegało wolniej, z uwagi na większą początkową zawartość węglowodorów oraz trudności w napowietrzaniu gruntu. Towarzyszył mu wzrost liczebności bakterii oraz aktywności dehydrogenazowej gruntu (rys. 4 i 5). Bakterie najliczniej występowały w powierzchniowych warstwach gruntu do 1 m. Analizy wykazały, że znaczący spadek zawartości węglowodorów naftowych w gruncie nastąpił w punkcie P2 na przełomie lipca i sierpnia. Zmniejszenie zawartości węgla organicznego spowodowało także ograniczenie rozwoju mikroorganizmów, stąd też w tym samym czasie zaobserwowano gwałtowny spadek liczby bakterii (rys. 4).



Rys. 4. Średnia liczba bakterii w gruncie podczas bioremediacji (P2)
Fig. 4. Number of bacteria in soil during bioremediation (measuring point P2)

Prace bioremediacyjne kontynuowano we wrześniu i październiku. Wyniki przeprowadzonych w połowie października analiz gruntu wskazywały na dobrą skuteczność procesu remediacji. Uzyskano zmniejszenie zawartości produktów naftowych w gruncie średnio do ok. 50 mg/kg. Zanotowano też mniejszą liczebność i aktywność drobnostrójów. Średnia aktywność dehydrogenazowa gruntu wynosiła 12,7 µgTF/g·24 h (rys. 5).

Doczyszczanie pryzmy w fazie III polegało na stopniowym zbieraniu powierzchniowych warstw gruntu, gdzie oznaczona zawartość produktów naftowych była minimalna.



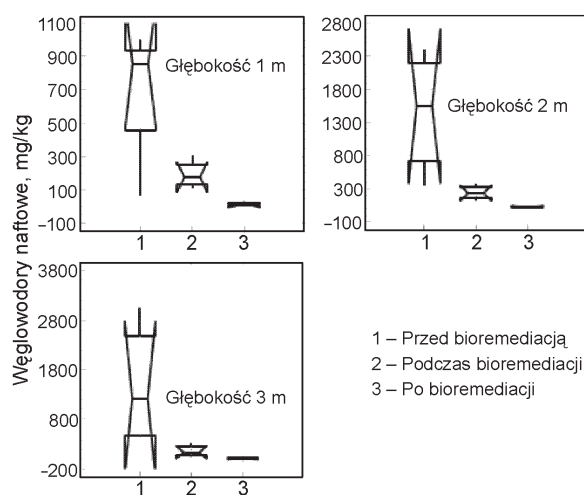
Rys. 5. Średnia aktywność dehydrogenazowa gruntu
Fig. 5. Dehydrogenase activity of soil

Pozwoliło to na odkrycie dolnych warstw gruntu, do których dostęp tlenu był wcześniej ograniczony. Początkowo obniżono przyzmę o ok. 1 m. Po dwóch tygodniach intensywnej bioremediacji i polepszenia natlenienia gleby uzyskano zawartość produktów naftowych <1 mg/kg w następnej warstwie gruntu. Umożliwiło to dalszą obniżenie przyzmy do wysokości ok. 1 m (180 t) i ostateczne doczyszczanie gruntu. Zawartość produktów naftowych w gruncie po przeprowadzeniu III fazy procesu remediacji wahała się w granicach $1,9 \div 21,3$ mg/kg. Pod względem jakościowym były to węglowodory lub substancje organiczne o temperaturze wrzenia odpowiadającej węglowodom $>C_{25}$. Wartości pozostałych wskaźników jakości gruntu uległy zmniejszeniu do stanu sprzed bioremediacji (tab. 2).

Zaobserwowano, że początkowo zawartość produktów naftowych w poszczególnych punktach pomiarowych znacznie się różniła. W toku procesu bioremediacji nastąpiło wyrównanie zawartości zanieczyszczeń i były one zbliżone we wszystkich punktach poboru próbek. Zjawisko to potwierdziła wykonana analiza statystyczna. Rysunek 6 przedstawia graficznie obraz analizy statystycznej zawartości produktów naftowych w gruncie na głębokościach 1 m,

Tabela 3. Charakterystyka fizyczno-chemiczna odcieku z przyzmy
Table 3. Results of physicochemical parameters of the effluent from the prism

Wskaźnik, jednostka	Przed bioremediacją	Podczas bioremediacji	Po bioremediacji
Przewodność właściwa, $\mu\text{S}/\text{cm}$	1817	1322	1115
pH	7,10	7,14	7,57
Zasadowość ogólna, mol/m^3	20,0	10,2	7,7
Kwasowość, mol/m^3	1,2	0,7	0,7
Utlenialność, gO_2/m^3	256	165	135
BZT ₅ , gO_2/m^3	430	22	25
ChZT, gO_2/m^3	1322	615	479
Ekstrakt eterowy, g/m^3	45	34	10
Fosfor ogólny, gP/m^3	0,59	1,47	0,26
Fosforany, gP/m^3	0,15	nw.	0,06
Chlorki, gCl^-/m^3	151	147	143
Siarczany, $\text{gSO}_4^{2-}/\text{m}^3$	7	131	144
Azot organiczny, gN/m^3	10,5	7,0	7,0
Azot amonowy, gN/m^3	6,3	7,0	4,2
Azotyny, gN/m^3	nw.	nw.	0,03
Azotany, gN/m^3	nw.	nw.	3,2
Azot Kjeldahla, gN/m^3	16,8	14,0	11,2
Azot ogólny, gN/m^3	16,8	14,0	14,4
Sucha pozostałość, g/m^3	2298	1438	1340
Pozostałość po prażeniu, g/m^3	1278	837	808
Strata prażenia, g/m^3	1020	601	532
Ciała rozpuszczone, g/m^3	2092	1391	1260
Ciała rozp. mineralne, g/m^3	1184	825	800
Ciała rozpuszczone lotne, g/m^3	908	566	460
Zawiesiny ogólne, g/m^3	206	47	80
Zawiesiny mineralne, g/m^3	94	12	8
Zawiesiny lotne, g/m^3	112	35	72



Rys. 6. Przedział ufności (95%) względem mediany zawartości produktów naftowych w gruncie
Fig. 6. Confidence interval (95%) for the median parameters of petroleum product concentration in soil

2 m i 3 m przed, podczas i po bioremediacji. Z zależności widać, że rozkład stężeń produktów naftowych był znacząco i asymetrycznie zróżnicowany względem mediany, szczególnie przed bioremediacją. Świadczy o tym wielkość zagięć na końcach tzw. skrzynek. W toku bioremediacji szerokość skrzynek zmalała. Zatem należy uznać, że zmalało także zróżnicowanie stężeń produktów naftowych w gruncie. Po procesie bioremediacji rozrzut uzyskanych wyników był znikomy.

Zadaniem opracowanej technologii było także doczyszczanie odcieku z przyzmy do jakości zapewniającej całkowite zahamowanie wymywania zanieczyszczeń lub ich metabolitów z gruntu. W początkowej fazie zanieczyszczenie odcieku było duże, co uniemożliwiało odprowadzanie go do wód i ziemi. W toku procesu bioremediacji zaobserwowano wyraźną poprawę wskaźników charakteryzujących jakość odcieku. Przekroczono zostało jedynie ChZT oraz w bardzo niewielkim stopniu azot amonowy. Ilość wymywanych z gruntu zanieczyszczeń znacznie zmalała, co podkreśla skuteczność prowadzonych prac remediacyjnych. (tab. 3).

Zakończenie prac polegało na wywiezieniu oczyszczonego gruntu na składowisko odpadów komunalnych. Po uporządkowaniu terenu składowania dokonano analizy zawartości produktów naftowych w gruncie pod geomembraną, na której umieszczona była przyzma. Stwierdzono, że nie doszło do przerwania ciągłości folii i przedostania się zanieczyszczeń do gruntu na wyznaczonym terenie.

Dyskusja i podsumowanie

Bioremediacja jest powszechnie znaną metodą usuwania zanieczyszczeń naftowych ze środowiska gruntowowodnego. Jednakże uzyskiwana skuteczność oczyszczania jest bardzo zróżnicowana. Wynika to z bezpośredniego wpływu bardzo wielu czynników fizyczno-chemicznych i biologicznych na aktywność degradacyjną mikroorganizmów glebowych [29–31]. Kontrola i regulacja tych parametrów zapewnia optymalny przebieg procesów degradacyjnych w toku oczyszczania [32,33]. Możliwość takiej zapewnienia prowadzenie bioremediacji metodą *ex situ*. Uzyskane wyniki badań wykazały przydatność tej metody do usuwania zanieczyszczeń naftowych z gruntu. Szybkość biodegradacji węglowodorów naftowych była wysoka dzięki odpowiedniej stymulacji przez wprowadzenie

dotychczasowego źródła azotu i fosforu oraz bioaugmentację gruntu. Ilość wprowadzanych substancji biogenych ustalono na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań własnych [17]. Wykorzystano także doświadczenia innych autorów, którzy wykazali, że wprowadzenie tego typu substancji przyspiesza biodegradację zanieczyszczeń olejowych zarówno w środowisku wodnym, jak i glebowym [7,8]. Zapotrzebowanie na substancje biogenne jest różne w zależności od składu ilościowego i jakościowego populacji mikroorganizmów glebowych. Dlatego też substancje biogenne wprowadzane były do gruntu partiami, zgodnie z zapotrzebowaniem mikroorganizmów, co umożliwiło utrzymanie populacji mikroorganizmów na odpowiednim poziomie. W efekcie nie doprowadzono do nadmiaru biogenów w gruncie, który mógłby hamować aktywność mikrobiologiczną organizmów. Po zakończeniu bioremediacji stanowiłyby one niepożądany balast stanowiący zagrożenie wód eutrofizacją [3]. Po zakończeniu procesu zawartość substancji biogenych w gruncie była zbliżona do ich ilości przed bioremediacją (tab. 2).

Osiągnięta bardzo duża skuteczność usuwania zanieczyszczeń naftowych możliwa była dzięki starannemu doborowi mikroorganizmów autochtonicznych, który prowadzony był zgodnie z sugestiami innych autorów oraz wynikami badań własnych [6,9,17,18]. Stosując biopreparaty zawierające mikroorganizmy autochtoniczne uniknięto etapu adaptacji mikroorganizmów do nowych warunków środowiskowych oraz utrzymywano liczebność bakterii na wysokim poziomie w całej objętości pryzmy na wszystkich etapach oczyszczania [3,5]. Pozwoliło to także na równomierne rozprzodzenie mikroorganizmów w gruncie, umożliwiając biodegradację zanieczyszczeń także w głębszych warstwach pryzmy [34]. Powszechnie uważa się, że w środowiskach niepodlegających skażeniu mniej niż 1% ogólnej liczby bakterii stanowią bakterie degradujące węglowodory. Ich liczebność wzrasta do 10% w gruntach skażonych [3,5]. Dalszy rozwój mikroorganizmów ograniczony jest istniejącymi warunkami środowiskowymi. Wprowadzenie aktywnych degradacyjnie bakterii i jednoczesna korekta parametrów mających wpływ na ich rozwój w gruncie umożliwia znaczne przyspieszenie procesu bioremediacji. Dodatkowym, ważnym, atutem bioaugmentacji jest możliwość sterowania zarówno składem ilościowym, jak i jakościowym populacji degradatorów. Wiadomo, że wiele związków wchodzących w skład produktów naftowych należy do trudnobiodegradowalnych [3,5], dlatego też mogły być one degradowane dopiero w ostatniej fazie oczyszczania biopreparatem zawierającym odpowiednio przystosowane mikroorganizmy.

Prawidłowy przebieg procesu bioremediacji uzyskano dzięki opracowanej technologii, zapewniającej utrzymanie na właściwym poziomie wszystkich parametrów gwarantujących rozwój mikroorganizmów glebowych. Uzbrojenie techniczne pozwoliło na dotlenienie wody i gruntu, rozprzodzenie biogenów, mikroorganizmów oraz właściwą infiltrację wody. System stałej recyrkulacji wody w układzie pryzma–bioreaktor i wody gruntowe–bioreaktor zapewnił prawidłowy przebieg procesu oczyszczania oraz produkcję aktywnej biomasy służącej do inokulacji.

Przyjęty system monitoringu pozwolił na skuteczne sterowanie procesem bioremediacji. Obok analizy wskaźników fizyczno-chemicznych gruntu i odcieku z pryzmy proces bioremediacji kontrolowany był w oparciu o wskaźniki biologiczne. Zastosowanie aktywności biologicznej, jako instrumentu monitoringu wynikało z korelacji między wartościami tych wskaźników a zawartością zanieczyszczeń

naftowych w gruncie. Stwierdzono, że liczebność mikroorganizmów oraz ich aktywność enzymatyczna znacznie wzrastała wraz ze zwiększaniem zawartości węglowodórów, co było szczególnie widoczne w początkowej fazie bioremediacji.

Przeprowadzone badania wykazały bardzo dużą skuteczność opracowanej metody oczyszczania gruntu z zanieczyszczeń naftowych. Ostateczna zawartość produktów naftowych była znacznie mniejsza od wartości dopuszczalnych przyjętych zarówno w przypadku gruntu, jak i wód [35,36]. Na podkreślenie zasługuje też fakt, że przyjęty sposób oczyszczania gruntu był bezpieczny dla środowiska i zdrowia człowieka.

LITERATURA

1. J. SIUTA: Ekologiczne, technologiczne i prawne aspekty rekultywacji gruntów zanieczyszczonych produktami naftowymi. *Inż. Ekol.* 2003, nr 8, ss. 6–25.
2. B. KOŁWZAN, K. GRABAS: Metody remediacji środowiska gruntowo-wodnego skażonego produktami naftowymi. Cz. 1 i 2. *Branż. Mag. Przem. Chemia Przemysłowa* 2003, nr 3, ss. 52–57.
3. R.M. ATLAS, R. BARTHA: Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. *Adv. Microbial Ecol.* 1992, No. 2, pp. 287–338.
4. R. MARGESIN, F. SCHINNER: Biological decontamination of oil spills in cold environments. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 1999, Vol. 74, pp. 1–9.
5. A. MROZIK, Z. PIOTROWSKA-SEGET, S. ŁABUŻEK: Bacteria in bioremediation of hydrocarbon-contaminated environments. *Postępy Mikrobiol.* 2005, vol. 44, nr 3, ss. 227–238.
6. M. ŁEBKOWSKA: Wykorzystanie mikroorganizmów do biodegradacji produktów naftowych w środowisku glebowym. *Gaz, Woda i Techn. Sanit.* 1996, nr 3, ss. 117–118.
7. F.M. BENTO, F.A.O. CAMARGO, B.C. OKEKE, W.T. FRANKENBERGER Jr.: Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology* 2005, Vol. 96, pp. 1049–1055.
8. L. RUBERTO, S.C. VAZQUEZ, W.P. MAC CORMACK: Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and biodegradation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2003, Vol. 52, pp. 115–125.
9. P. KASZYCKI, M. TYSZKA, P. MALEC, H. KOŁOCZEK: Formaldehyde and metanol biodegradation with the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. An application to real wastewater treatment. *Biodegradation* 2001, 12(3), pp. 169–177.
10. R. BOOPATHY: Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* 2000, Vol. 74, pp. 63–67.
11. H.M. BROWN, J.S. GOUDEY, J.M. FOGHT, S.K. CHENG, M. DALE, J. HODDINOTT, L.R. QUAIFFE, L.M. CARMICHAEL, F.K. PFAENDER: The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. *Biodegradation* 1997, No. 8, pp. 1–13.
12. S.K. SAMANTA, O.V. SINGH, R.K. JAIN: Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 2002, Vol. 20, pp. 243–248.
13. D.B. KNAEBEL, T.W. FEDERLE, D.C. MC AVOY, J.R. VESTAL: Effect of mineral and organic soil constituents on microbial mineralization of organic compounds in natural soil. *Applied Environmental Microbiology*, 1994, No. 12, pp. 4500–4508.
14. S.J. JOHNSON, K.J. WOOLHOUSE, H. PROMMER, D.A. BARRY, N. CHRISTOFI: Contribution of anaerobic microbial activity to natural attenuation of benzene in groundwater. *Eng. Geol.* 2003, Vol. 70, pp. 343–349.

15. M. MALICKA: Biotechnologiczne metody oczyszczania gleb skażonych związkami ropopochodnymi i innymi toksycznymi związkami organicznymi. *Gaz, Woda i Techn. Sanit.* 1994, nr 2, ss. 40–46.
16. R.S. KERR [Ed.]: Leaking Underground Storage Tanks: Remediation with Emphasis on *in situ* Bioremediation. U.S. Environmental Protection Agency, EPA 600/2-87/008, Ada OK 1987.
17. B. KOŁWZAN: Bioremediacja gleb skażonych produktami naftowymi wraz z oceną ekotoksykologiczną. Prace Naukowe Instytutu Inżynierii Ochrony Środowiska Politechniki Wrocławskiej nr 79, seria Monografie nr 44, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2005.
18. B. KOŁWZAN: Ocena przydatności inokulantów do bioremediacji gleby skażonej produktami naftowymi. *Ochrona Środowiska* 2008, vol. 30, nr 4, ss. 3–14.
19. R. MARGESIN, A. ZIMMERBAUER, F. SCHINNER: Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* 2000, Vol. 40, pp. 339–346.
20. L.E. CASIDA, J.O. KLEIN, T. SATORO: Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 1964, 989, pp. 371–373.
21. S. RUSSEL: Metody oznaczania enzymów glebowych. Polskie Towarzystwo Gleboznawcze, Warszawa 1972.
22. W. HERMANOWICZ: Fizyczno-chemiczne badania wody i ścieków. Arkady, Warszawa 1976.
23. A. DĄBROWSKI, S. GNÓT, A. MICHALSKI, J. SRZEDNICKA: Statystyka. 14 godzin z pakietem STATGRAPHICS®. Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Wrocław 1994.
24. E. ŚLIWKA: Oznaczanie zanieczyszczeń naftowych w glebie. W: Zanieczyszczenia naftowe w gruncie [red. J. SURYGALA]. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2000.
25. E. ŚLIWKA, B. KOŁWZAN, J. SURYGALA: Ocena przebiegu procesu biodegradacji oleju napędowego w glebie. *Biuletyn ITN* 2000, vol. 12, nr 2, ss. 104–109.
26. T. WATANABE, T. HIRAYAMA: Genotoxicity of soil. *Journal of Health Science* 2001, Vol. 47, No. 5, pp. 433–438.
27. B. KOŁWZAN: Effect of bioremediation on genotoxicity of soil contaminated with diesel oil. *Environment Protection Engineering* 2009, Vol. 35, No. 1, pp. 95–103.
28. Z. STRADOWSKI, L. ZALEWSKI, M. SIENKIEWICZ: Projekt techniczno-technologiczny rekultywacji gruntu zgradowanego na tymczasowym składowisku w Łężyicy, woj. lubuskie. Wrocław 1999 (praca niepublikowana).
29. M. HAWROT, A. NOWAK: Evaluation of microorganisms' activity in a process of diesel fuel biodegradation during culturing under laboratory conditions. *Pol. J. Natur. Sci.* 2003, Vol. 15, No. 3, pp. 619–628.
30. C.W. KAPLAN, L.K. CHRISTOPHER: Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Applied and Environmental Microbiology* 2004, Vol. 70, No. 3, pp. 1777–1786.
31. P. MORGAN, R.J. WATKINSON: Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 1989, No. 8, pp. 305–333.
32. W.T. FRANKENBERGER Jr., W.A. DICK: Relationship between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. *Soil Science Society of America Journal* 1983, Vol. 47, No. 5, pp. 945–951.
33. W. PRZYSTAŚ, K. MIKSCH, A. MAŁACHOWSKA-JUTSZ: Zmiany aktywności enzymatycznej gleby w procesie biodegradacji zanieczyszczeń naftowych przy użyciu biopreparatów. *Arch. Ochrony Środowiska* 2000, vol. 26, nr 2, ss. 59–70.
34. K. WATANABE, H. FUTAMATA, S. HARAYAMA: Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of bioremediation strategy. *Antonie van Leeuwenhoek* 2002, Vol. 81, pp. 655–663.
35. Rozporządzenie Ministra Środowiska z 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi. DzU nr 165, poz. 1359.
36. Rozporządzenie Ministra Środowiska z 24 lipca 2006 r. w sprawie warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu ścieków do wód lub do ziemi oraz w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego. DzU nr 137, poz. 984.

Kołwzan, B. Removal of Petroleum Products from Soil by the Prism Method. *Ochrona Środowiska* 2009, Vol. 31, No. 2, pp. 3–10.

Abstract: The aim of the study was to assess the efficiency of soil cleanup from petroleum products, whose concentrations in the dry mass ranged from approx. 70 mg/kg to as much as approx. 3,000 mg/kg. In order to remove those specific, troublesome and nuisance-causing contaminants, use was made of the prism method consisting in the bioaugmentation of the prism. The prism was inoculated using an original biopreparation, which contained autochthonous bacteria of the species *Stenotrophomonas maltophilia* and *Pseudomonas putida*, isolated from the contaminated soil. The technical appliances used made it possible to aerate the soil, spread biogens and microorganisms, and control moisture content. The course of the bioremediation process was monitored by analyzing the physicochemical and microbiological parameters of the soil and those of the leachate from the prism. The process itself proceeded in three stages: preliminary (I), bioremediation (II) and after-treatment (III). Stage (I) occurred in the winter season, under conditions of limited oxygen availability and low soil temperature. At that stage, in spite of the disadvantageous conditions for microorganism growth, the removal of petroleum products from the soil varied from approx. 30 mg/kg to approx. 2500 mg/kg, which depended on the initial content of these pollutants in the soil being biodegraded. The bioremediation process was the most intense in the spring

and summer seasons (stage II), which were characterized by enhanced growth and enhanced degrading activity of the soil bacteria in the whole cross-section of the prism. The decrease in the organic carbon concentration in the soil observed at the end of stage II exerted a limiting effect on microorganism growth, thus contributing to a rapid reduction in the number of bacteria. There was also a concomitant decrease in the degrading activity of the microorganisms: the value of the dehydrogenase activity of the soil averaged 12.7 mgTF/g·24 h. During stage II of the bioremediation process the content of petroleum products in the soil was reduced to approx. 50 mg/kg on average. The aftertreatment of the prism (stage III) was performed in the autumn season and consisted in the consecutive stripping of the surface layer, where the content of petroleum products was minimal. This enabled a gradual uncovering of the lower prism layers (those with limited oxygen availability) and their aftertreatment. Upon termination of stage III of the bioremediation process, the content of petroleum products in the soil ranged from approx. 2 mg/kg to approx. 20 mg/kg. The study has demonstrated that the technology applied was environment-friendly and safe, and that the continuous water recirculation in the prism–bioreactor system enabled the aftertreatment of the leachates from the prism to the level desired.

Keywords: Petroleum products, soil, decontamination, bioremediation, prism method, inoculant, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*.